

## SCANNING OPTICAL MICROSCOPE

TANAAMI 10/769,017

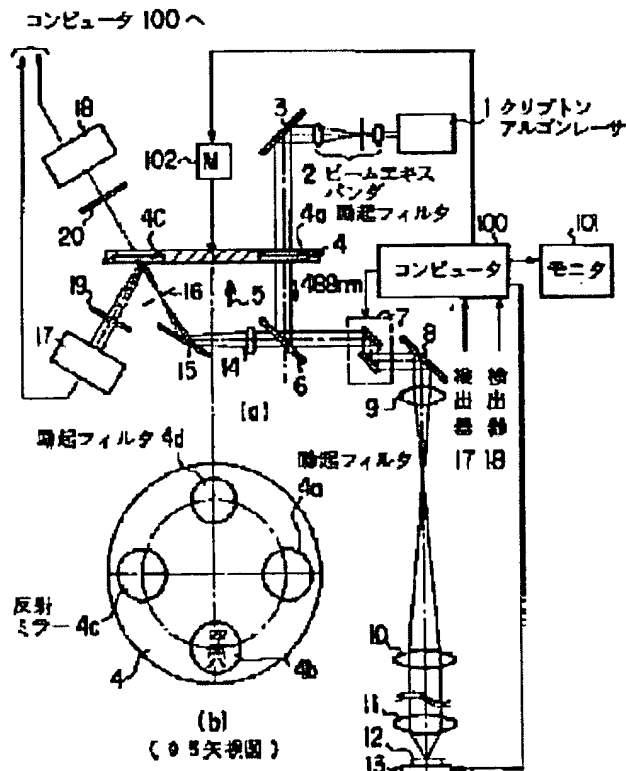
Patent number: JP10206745  
 Publication date: 1998-08-07  
 Inventor: SASAKI HIROSHI  
 Applicant: OLYMPUS OPTICAL CO LTD  
 Classification:  
 - international: G02B21/16; G01N21/64  
 - european:  
 Application number: JP19970009520 19970122  
 Priority number(s):

Report a data error here

## Abstract of JP10206745

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To remove a fluorescent stroke and to suppress the time delay of every observation due to plural excited wavelengths by switching the setting of excited wavelength and optical path for every frame scanning or every line scanning or under the photodetection of one pixel synchronously with scanning.

**SOLUTION:** Laser light oscillated by a krypton argon laser 1 is expanded into desired beam diameter by a beam expander 2 and made incident upon a turret 4 for selecting the wavelength of 488nm or 568nm by a reflection mirror 3. The turret 4 is composed of a rotary plate having exciting filters 4a and 4d, reflection mirror 4c and hole 4b. The exciting filter 4a transmits the light of 488nm and the filter 4d transmits the light of 568nm respectively. Synchronously with the scan of optical scanning system 7, the turret 4 is rotated at 90 deg. for every frame scanning, electric signals respectively detected by photodetectors 17 and 18 are successively fetched into a computer 100, pseudo color processing into green and red is respectively performed and these signals are displayed on a monitor 101 while being overlapped.



BEST AVAILABLE COPY

特開平10-206745

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月7日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

G02B 21/16

G02B 21/16

G01N 21/64

G01N 21/64

E

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全14頁)

(21) 出願番号 特願平9-9520

(22) 出願日 平成9年(1997) 1月22日

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 佐々木 浩

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

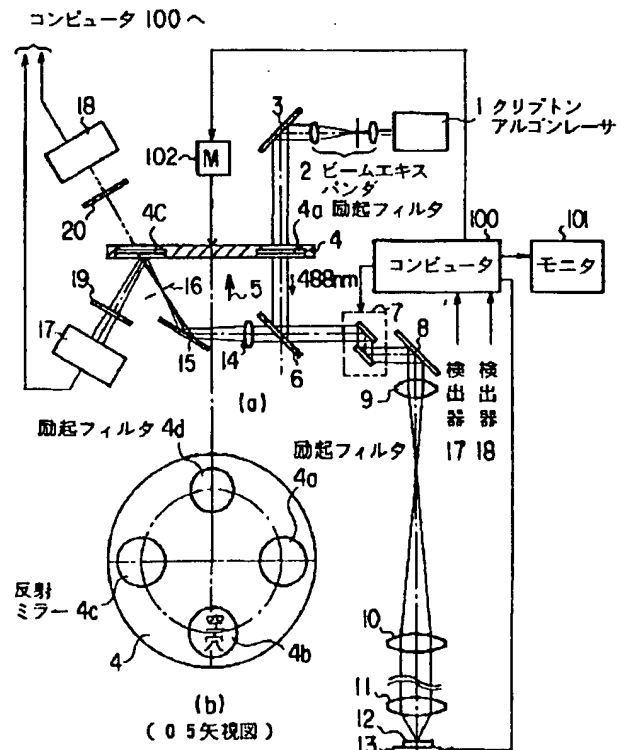
(74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

(54) 【発明の名称】 走査型光学顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 蛍光クロストークを除去し、かつ、複数の励起波長による各々の観察の時間的な遅れを抑えること。

【解決手段】 光源1からの光ビームを標本に照射し走査機構7によって光ビームで走査する走査型光学顕微鏡であり、光源1から標本12に至る光路の途中で2種以上の励起波長の中から1種づつ波長を選択する波長選択手段4a、4dと、2種以上の励起波長で夫々励起される各蛍光を個別に検出すべく設けられた複数の検出器17、18と、標本12から発した蛍光をその励起波長に対応した検出器へ導くように波長選択動作に連動して光路を選択する光路選択手段4b、4cと、走査機構7による走査に同期して1フレーム走査、1ライン走査又は1画素毎に選択励起波長及び選択光路を切換える手段100とを具備して構成される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 光源からの光ビームを標本に照射し走査機構によって前記標本を前記光ビームで走査する走査型光学顕微鏡において、

前記光源から前記標本に至る光路の途中で 2 種以上の励起波長の中から 1 種づつ波長を選択する波長選択手段と、

前記 2 種以上の励起波長で夫々励起される各蛍光を個別に検出すべく設けられた複数の検出器と、

前記標本から発した蛍光をその励起波長に対応した検出器へ導くように前記波長選択手段の波長選択動作に連動して光路を選択する光路選択手段と、

前記走査機構による走査に同期して 1 フレーム走査、1 ライン走査又は 1 画素受光中に前記波長選択手段による選択励起波長及び前記光路選択手段による選択光路を切換える手段とを具備したことを特徴とする走査型光学顕微鏡。

【請求項 2】 請求項 1 記載の走査型光学顕微鏡において、

前記波長選択手段及び前記光路選択手段は、前記光源から前記標本に至る光路と前記標本から発した蛍光の通過する蛍光光路とを同時に遮る回転板を配置し、当該回転板において光源から標本に至る光路が遮られる部分を含む同一円上に各々波長帯域の異なる励起波長が通過する励起フィルターを設け、前記回転板において前記蛍光光路が遮られる部分を含む同一円上であって前記各励起フィルターが光路上に配置されたときに蛍光光路を遮る各々の位置にそのとき光路上に配置された励起フィルターに対応した検出器へ蛍光を導く反射ミラー又は空穴を設けてなることを特徴とする走査型光学顕微鏡。

【請求項 3】 請求項 1 記載の走査型光学顕微鏡において、

前記波長選択手段は、各々波長帯域の異なる励起波長が通過する複数の励起フィルターと、前記光源側から入射する光ビームを偏向させていずれかの励起フィルターへ入射する偏向素子とを含んでなり、

前記光路選択手段は、前記標本から入射する蛍光をその励起波長に対応した検出器へ導くように偏向させる偏向素子を含むことを特徴とする走査型光学顕微鏡。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、多重染色された蛍光試料を複数の励起波長を用いて励起して各励起波長に対応して発生した複数の蛍光を観察する走査型光学顕微鏡に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 異なる蛍光色素により多重染色された試料を複数の励起波長で励起して、発生した複数の蛍光を複数の検出器で検出する走査型光学顕微鏡があり、例えば USP 5, 127, 730 に開示されている。

【0003】 図 18 に、そのスキャンヘッド部の概略構成を示す。488 nm、568 nm、647 nm 等の波長を同時発振するクリプトンアルゴンレーザ 501 から発した多波長レーザ光を励起フィルタブロック 502 に入射して特定の励起波長を抽出する。励起フィルタブロック 502 で 3 種類の励起フィルタ 503 a、503 b、503 c を選択的に光路上に配置することにより励起波長を切り換える。

【0004】 503 a は、488 nm と 568 nm を透過させる励起フィルタで、図 19 (1) の上段 (二帯域励起) 553 a、553 b にその透過特性を示している。また 503 b は、488 nm の波長のみを透過させる励起フィルタで、図 19 (1) の中段 (488 DF 10) 551 にその透過特性を示す。また、503 c は 568 nm の波長のみを透過させる励起フィルタで図 19 (1) の下段 (568 DF 10) 552 にその透過特性を示す。

【0005】 励起フィルタブロック 502 の一つの励起フィルタで抽出した励起波長をフィルタブロック #1 に入射して検体 505 側へ反射させる。フィルタブロック #1 の 2 色ダイクロイックミラー 504 で、488 nm 及び 568 nm の励起光を反射させ、第 1、第 2 の試薬で多重染色した検体 505 に照射する。2 色ダイクロイックミラー 504 は図 19 (2) の 555 に示す透過特性を有しており、488 nm のラインにより励起される第 1 の試薬から発せられた蛍光の 500 ~ 540 nm の波長範囲と、568 nm のラインにより励起される第 2 の試薬から発せられた蛍光の 585 ~ 650 nm の波長範囲とを透過させる。

【0006】 フィルタブロック #1 を透過した蛍光をフィルタブロック #2 に入射し、ダイクロイックミラー 521 により 500 ~ 540 nm の光を反射させ検出器 506 に入射し、585 ~ 650 nm の光を透過させ検出器 507 に入射し、488 nm と 568 nm の反射光はバリアフィルタ 522、523 によりカットされる。フィルタブロック #2 内のダイクロイックミラー 521 の特性を図 19 (3) の上段 (561) に、バリアフィルタ 522、523 の特性を図 19 (3) の中段 (562)、下段 (563) に示す。

【0007】 以上の構成により、励起フィルタ 503 a が光路中にある時は、2 色ダイクロイックミラー 504 を、488 nm、568 nm のレーザー波長が図中下方に反射され、標本 505 に照射される。この波長により励起され、標本に染色されている第 1 の試薬から発せられた蛍光のうち 500 ~ 540 nm の範囲及び第 2 の試薬から発せられた蛍光の 585 ~ 650 nm の範囲が、2 色ダイクロイックミラー 504 を透過する。そして、フィルタブロック #2 のダイクロイックミラー 521 により 500 ~ 540 nm の光は反射して検出器 506 で検出され、585 ~ 650 nm の光は透過して検出器 5

0 7 で検出される。

【0 0 0 8】そして、図示しないガルバノミラーにより、検体 5 0 5 を 2 次元的に走査し、各走査位置での検出光を電気信号に変換し、図示しないモニタ上に 2 次元像として表示することになる。その時、それぞれの検出器 5 0 6、5 0 7 により検出された信号を色分けして一つのモニタに表示することにより、第 1 の試薬と第 2 の試薬のそれぞれから発せられた蛍光を識別することが可能となる。

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】このように、従来は第 1 の試薬の発する蛍光の波長の 5 0 0 ~ 5 4 0 nm の範囲を検出しているが、フレオレスセインの発する蛍光波長の範囲は 5 0 0 ~ 6 0 0 nm 以上まで分布しているので、長波長側蛍光は第 1 の試薬の発する蛍光として検出されるだけでなく、第 2 の試薬の発する蛍光 ( 5 8 5 ~ 6 5 0 nm ) を検出すべき検出器 5 0 7 に混入されてしまう不具合がある。この現象を一般に蛍光クロストークといい、2 重染色標本を観察する時に短波長側の蛍光が長波長側の蛍光にかぶることが知られている。

【0 0 1 0】この蛍光クロストークを完全に除去するには、励起フィルタ 5 0 3 b を光路に入れ、4 8 8 nm のレーザ波長のみを用いて第 1 の試薬の発する蛍光のみを検出器 5 0 6 で検出して観察し、次に励起フィルタ 5 0 3 c を光路に入れ 5 6 8 nm のレーザ波長のみを用いて第 2 の試薬の発する蛍光のみを検出器 5 0 7 で検出して観察することになる。

【0 0 1 1】なお、4 8 8 nm で観察する時は、検出器 5 0 7 側にも第 1 の試薬の蛍光が混入してくる ( 5 8 5 nm 以上の長波長側 ) ので、検出器 5 0 7 側の検出機能を停止するか、フィルタブロック # 2 のダイクロイックミラー 5 2 1 を全反射ミラーに変更し、すべての蛍光を検出器 5 0 6 側に反射させる必要が生じる。この場合、5 6 8 nm の観察時は、フィルタブロック # 2 のダイクロイックミラー 5 2 1 を取り去り、空穴にしておかなければならない。

【0 0 1 2】上記したように、4 8 8 nm と 5 6 8 nm による観察を 2 回に分けて行くと、2 つの観察の間に時間的遅れを生じる。標本に動き等がある場合、この遅れにより正確な観察ができなくなる。また、走査型光学顕微鏡の特徴である共焦点効果 ( 光軸方向に分解能を持つ ) を利用して、一平面走査観察後、ステージを移動させる等して焦点面を標本の厚さ方向に所定量ずらし、さらに一平面走査観察を行い、再び焦点面を所定量動かし一平面走査観察を行うという工程を繰り返し、厚さのある標本の断層像の観察を行う方法がある。通常、このような観察を X Y Z 観察といい、焦点面の移動と、走査の繰り返し作業は、1 つのコンピュータにより制御され、移動量 ( 1 回のずらし量 ) と移動範囲 ( 総移動量 ) を入力することにより、一連の作業を人手をかけること

なく、コンピュータで行う。従って、4 8 8 nm と 5 6 8 nm による観察を 2 回に分けて観察する場合、4 8 8 nm で一連の観察を行った後、5 6 8 nm で一連の観察を行うことになり、焦点移動回数が増えるのに応じて時間的な遅れが大きくなってしまう。また、焦点面移動機能の位置再現性が悪いと、4 8 8 nm と 5 6 8 nm で、別の平面を観察してしまうことになる。

【0 0 1 3】本発明は、以上のような実情に鑑みてなされたもので、蛍光クロストークを除去できるとともに、複数の励起波長による各々の観察の時間的な遅れを抑えることのできる走査型光学顕微鏡を提供することを目的とする。

【0 0 1 4】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するために以下のような手段を講じた。本発明は、標本を光ビームで走査する走査型光学顕微鏡において、2 種以上の励起波長の中から 1 種づつ選択する波長選択手段及び前記 2 種以上の各々の励起波長により励起される各々の蛍光を、それぞれ所望の光検出器へ導く光路選択手段を設け、各々の励起波長及びその励起波長により励起される各々の蛍光をそれぞれ対応する光検出器へ導く励起波長及び光路の設定を走査に同期して 1 フレーム走査毎に、1 ライン走査毎に又は 1 画素受光中に切り換えて各々の蛍光を対応する光検出器で検出する。

【0 0 1 5】本発明によれば、各々の励起波長とその励起波長により励起される各々の蛍光をそれぞれ対応する光検出器へ導くための励起波長及び光路の設定を走査に同期して 1 フレーム走査毎又は 1 ライン走査毎又は 1 画素受光中に切り換えて、2 つ以上の蛍光色素により染色された標本の各々の蛍光を、個々に対応する光検出器で検出しているので、蛍光クロストークを完全に除去できるとともに、各励起波長による観察の時間的な遅れを極力少なく、またはなくすることができる。

【0 0 1 6】波長選択手段及び光路選択手段を回転板の単体で構成する。光源から標本に至る光路と標本から発した蛍光の通過する蛍光光路とを同時に遮る回転板を配置し、当該回転板において光源から標本に至る光路が遮られる部分を含む同一円上に各々波長帯域の異なる励起波長が通過する励起フィルターを設け、回転板において蛍光光路が遮られる部分を含む同一円上であって各励起フィルターが光路上に配置されたときに蛍光光路を遮る各々の位置にそのとき光路上に配置された励起フィルターに対応した検出器へ蛍光を導く反射ミラー又は空穴を設ける。

【0 0 1 7】この発明によれば、回転板を回転させることにより励起波長選択と光路選択とが機械的に連動するので高速切り換えが可能になる。波長選択手段及び光路選択手段をガルバノミラー、音響光学偏向素子等の偏向素子を用いて構成する。波長選択手段は、各々波長帯域の異なる励起波長が通過する複数の励起フィルターと、光

源側から入射する光ビームを偏向させていずれかの励起フィルターへ入射する偏向素子とを含んだ構成とし、光路選択手段は、標本から入射する蛍光をその励起波長に対応した検出器へ導くように偏向させる偏向素子を含んだ構成とする。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

（第1の実施の形態）図1（a）に実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成を示している。

【0019】この走査型光学顕微鏡は、クリプトンアルゴンレーザ1で488nm、568nm等の波長を発振し、クリプトンアルゴンレーザ1の発振したレーザ光をビームエキスパンダ2で所望のビーム径に拡大して反射ミラー3によって488nm又は568nmの波長を選択するターレット4に入射している。

【0020】図1（b）にターレット4を同図（a）に示す矢印5方向から見た平面図を示している。ターレット4は、2つの励起フィルタ4a、4d及び反射ミラー4c、空穴4bを持つ回転板で構成されており、モータ102により回転制御される。励起フィルタ4aは488nm、励起フィルタ4dは568nmをそれぞれ透過させる特性を持つ。

【0021】励起フィルタ4aと反射ミラー4cとは回転軸を挟んで対称位置に配置され、励起フィルタ4dと空穴4bとは回転軸を挟んで対称位置に配置され、さらに励起フィルタ4aと励起フィルタ4dとは90度の角度でずれている。

【0022】ターレット4の励起フィルタで抽出した励起波長を励起ダイクロイックミラー6で反射させて走査光学系7に導いている。なお、励起ダイクロイックミラー6は図19（2）に示す特性を持ち、488nmと568nmを反射し、フレオレスセインより発する蛍光（500～540nm）とTEXAS RED<sup>TM</sup>より発する蛍光（585nm以上）を透過する特性を持つ。

【0023】走査光学系7はX、Yの2次元に光ビームを走査する偏向光学素子として1組のガルバノメータスキャナミラーで構成されており、これらのスキャナミラーは瞳投影レンズ9、結像レンズ10により対物レンズ11の瞳と共役関係になっている。走査光学系7でX、Y方向に偏向させた光ビームをミラー8を介して瞳投影レンズ9に入射する。12は標本、13はステージを示している。

【0024】また、励起ダイクロイックミラー6の走査光学系7側からみて透過側には結像レンズ14を配置している。結像レンズ14でミラー15を介して焦点ピンホール16上にビームを結像させる。17、18は光検出器を示し、488nm及び568nmの不要な反射光をカットするバリアフィルタ19、20がそれぞれ前面に配置される。

【0025】コンピュータ100は、ターレット4のモータ102と走査光学系7のミラー駆動部とを設定に基づいて制御する。例えば、走査光学系7で1フレーム毎にターレット4を90度回転させる。このような走査光学系7とターレット4との連動関係をコンピュータ100によって管理している。また、コンピュータ100は光検出器17、18から出力される信号をカラー処理してモニタ101にカラー表示させる機能を備える。

【0026】次に、以上のように構成された走査型光学顕微鏡の動作について説明する。図1に励起波長488nmによりフレオレスセインを励起し、その蛍光を検出している状態を示し、図2に568nmによりTEXAS RED<sup>TM</sup>を励起し、その蛍光を検出している状態を示している。

【0027】図1に示すように、ターレット4は488nmに透過特性を持つ励起フィルタ4aが反射ミラー3と励起ダイクロイックミラー6との間の光路上に配置され、反射ミラー4cが焦点ピンホール16を通過した光の進行路上に配置されている。図1においては、クリプトンアルゴンレーザ1を発振したレーザ光はビームエキスパンダ2により所望の径に拡大され、ミラー3で下方に反射される。そして、ターレット4上の励起フィルタ4aにより488nmの波長が選択される。そして、励起ダイクロイックミラー6で反射して走査光学系7を通過してからミラー8で反射して瞳投影レンズ9から結像レンズ10を通り、対物レンズ11により標本12上にビームスポットとして結像する。

【0028】そして、標本12上のフレオレスセインにより発せられた蛍光が、前記光路を逆にたどり励起ダイクロイックミラー6を透過する。励起ダイクロイックミラー6を透過した蛍光が結像レンズ14、ミラー15を介して共焦点ピンホール16を通過する。このとき、この蛍光の進行路上にはターレット4上のミラー4cが配置されているので、ミラー4cで反射されバリアフィルタ19で488nmの反射光をカットされた後、光検出器17で検出される。

【0029】走査光学系7を構成するガルバノメータスキャナミラーを振ることにより、光ビームを標本12上で2次元方向に走査することになり、各走査位置においての光検出器17により検出される光量を電気信号に変換する。

【0030】以上のように、図1の状態からXY方向に1回走査し、フレオレスセインより発した蛍光を、光検出器17で検出した直後にコンピュータ100からの指示でモータ102によりターレット4を90度回転させ、568nmを選択する励起フィルタ4dと空穴4bを各光路上に配置させる。

【0031】図2はターレット4を図1の状態から90度回転させた状態を示している。このような状態でクリプトンアルゴンレーザ1を発振した波長のうち568nm

mの波長が励起フィルタ4dにより選択され励起ダイクロイックミラー6を反射し標本12上にビームスポットとして結像する。そして、標本12上のTEXAS RED<sup>TM</sup>により発せられた蛍光が励起ダイクロイックミラー6を透過し、結像レンズ14、ミラー15を介して共焦点ピンホール16を通過する。このとき、蛍光の光路上にはターレット4上の空穴4bが配置されているので、ターレット4上の空穴4bを透過し、バリアフィルタ20で568nmの反射光をカットされ光検出器18で検出される。

【0032】ここでも、走査光学系7のガルバノメータスキャナミラーを振ることで、光ビームを標本12上で2次元に走査し、各走査位置において光検出器18により検出される光量を電気信号に変換してコンピュータ100に入力する。

【0033】図1、図2に示した2つの工程を走査光学系7の走査に同期して、1フレーム走査毎にターレット4を90度回転させることにより行い、光検出器17、18で検出した電気信号をコンピュータ100に順次取り込む。そして、たとえば、光検出器17によるものを緑色に光検出器18によるものを赤色に疑似カラー処理してモニタ101上に重ねて表示する。

【0034】このような実施の形態によれば、走査光学系7で1フレーム走査を行い、フレオレスセインの発した蛍光を光検出器17で取得した直後に励起フィルタ4a、4dと光検出器17、18への光路の設定を切り換えて、もう一度、1フレーム走査を行い、TEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光を光検出器18で取得しているの  
で、フレオレスセインの発した蛍光は光検出器18側にかぶる（混入する）ことなく光検出器17で検出され、  
またTEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光もすべて光検出器18で検出されるので、蛍光クロストークを完全に除去できる。また、ターレット4を回転させるだけで使用する励起波長と検出器を簡単に切換えることができるので、フレオレスセインとTEXAS RED<sup>TM</sup>の観察の時間差を極力少なくできる。

【0035】（第2の実施の形態）標本を光軸方向の複数のスライス面でスライスしたスライス画像を取得する共焦点走査型レーザ顕微鏡において、各スライス面で1フレーム走査毎に第1の実施の形態と同様の2波長切り換え観察を行う。

【0036】この実施の形態は、さらにステージ13を光軸方向に一平面の観察毎に移動させる観察方法（XYZ観察）を実現するXYZ観察プログラムをコンピュータ100に登録しておく。

【0037】図3（a）は標本12の上部を観察するときの状態を示しており、21がその観察面となっている。観察面21に焦点を合わせた状態で、ターレット4を回転させて図1に示す状態にする。そして、励起フィルタ4aで抽出した488nmの励起光を標本12に照

射して蛍光を発生させると共に、走査光学系7で観察面21を1フレーム分走査する。標本12上のTEXAS RED<sup>TM</sup>により発せられた蛍光は、ダイクロイックミラー27を透過し、ミラー15、4cを介して光検出器17で検出される。1フレーム走査が終了したら、即座にターレット4を90度回転させて励起フィルタ4dで抽出した568nmの励起波長を標本12に照射して蛍光を発生させると共に、走査光学系7で同一観察面21を1フレーム分走査する。標本12上のTEXAS RED<sup>TM</sup>により発せられた蛍光は、ダイクロイックミラー27を透過し、ミラー15、空孔4bを介して光検出器18で検出される。この結果、コンピュータ100に観察面21を2波長で走査した2つの画像が取得されたことになる。

【0038】次にステージ13を上方へ移動し、図3（b）の状態とする。この状態では標本12の中心部22が観察面となっている。観察面22に焦点を合わせた状態で、励起フィルタ4aで抽出した488nmの励起光を標本12に照射し、走査光学系7で観察面22を1フレーム分走査したら、即座にターレット4を90度回転させて励起フィルタ4dで抽出した568nmの励起波長を標本12に照射して同一観察面22を1フレーム走査することにより、上記と同様に488nmの励起光による標本12からの蛍光は光検出器17で検出され、568nmの励起光による標本12からの蛍光は検出器18で検出される。この結果、コンピュータ100に観察面22を2波長で走査した2つの画像が取得されたことになる。

【0039】さらにステージ13を上方へ移動し、図3（c）の状態とする。この状態では標本12の下部23が観察面となる。観察面23に焦点を合わせた状態でも、上記同様に走査光学系7の走査とターレット4の回転動作とを連動させて2波長観察して観察面23の2つの画像を取得する。

【0040】以上の一連の動作をコンピュータ制御で行うことにより、蛍光クロストークを完全に除去でき、かつ2種の蛍光取得の時間的な遅れを極力、少なくとも2種染色標本のXYZ観察が可能となる。標本のXYZ観察方法としては、ステージ移動方式の他に、対物レンズをZ方向に移動させながらステージをXY方向に移動させることもできる。またフォーカルな光学系の光路中に焦点距離を補正する厚さの異なる複数の光路長補正板を選択挿入できるようにすることもできる。

【0041】（第3の実施の形態）所定の時間間隔毎に一平面の観察画像を取り込んで標本の時間的な変化を追うXYZ観察に、第1の実施の形態で示した工程を適用する。

【0042】この実施の形態は、走査型光学顕微鏡を第1の実施の形態と同様に構成し、XYZ観察を実現する観察プログラムをコンピュータ100に登録する。今、

10

20

30

40

50

コンピュータ100により入力されたインターバル（時間間隔）を $t$ 分とする。まず、第1の実施の形態と同様に、ターレット4の回転と走査光学系7の動作とを連動させて1フレーム走査毎に励起波長を切り換えて、フレオレスセインの発した蛍光と、TEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光とを順次取得し、1回の画像取得工程を終了する。

【0043】次に、前回の画像取得完了から $t$ 分経過後に、再び上記同様の手法によりフレオレスセイン、TEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光を順次取得する。このよ

うな処理をコンピュータ100の管理下で $t$ 分毎に実行し、予めコンピュータ100に指定された回数だけ繰り返す。これにより、蛍光クロストークがなく、かつ2種の蛍光取得の時間的な遅れを極力、少なくした2重染色

標本のXYZ観察が可能となる。

【0044】（第4の実施の形態）光源に488nmを発振するアルゴンレーザと700nmの赤外光をパルス状に発振するレーザを用いることで、赤外のパルスレーザを走査型光学顕微鏡に適用し、赤外のパルスレーザを集光させることで2光子励起を発生させるものである。

【0045】UV光により励起され450nm近辺の蛍光を発する色素DAPIに700nmの赤外パルスレーザを照射して励起すると、450nm近辺の蛍光を発することができる。このような赤外のパルスレーザを集光させる2光子励起では赤外光で集光しているため厚みのある標本内の屈折による結像性能の劣化が起きにくいというメリットがある。

【0046】図4は、本実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図であり、図1及び図2に示したものと同一機能の部位には同一符号を付けている。この実施の形態は、488nmを発振するアルゴンレーザ24からのレーザ光と700nmのパルスを発振するパルスレーザ25からのレーザ光とを、488nmを反射し700nmを透過させる特性を持つダイクロイックミラー26により一つの光路上に導いている。

【0047】また、ターレット4上に700nmのパルスレーザを選択する励起フィルタ4eが備えられている。励起ダイクロイックミラー27の特性は、図6に示すように488nmと700nmを反射し、それ以外の波長を透過するようになっている。

【0048】また、光検出器18の前面に568nmの反射光をカットするバリアフィルタ20に代えて、700nmの反射光をカットするバリアフィルタ28を備えている。標本29はDAPI及びフレオレスセインで2重染色されている。

【0049】次に、この実施の形態の動作について説明する。まず、図4の状態にターレット4を位置させることにより、光路上に488nmの励起フィルタ4aとミラー4cを配置し、アルゴンレーザ24より発振した488nmのレーザ光を用いて、フレオレスセインの発す

る蛍光を光検出器17側で検出する。

【0050】そして、1フレーム走査後にターレット4をモータ102により90°回転させ、光路上に励起フィルタ4e及び空穴4bを配置させる。これにより、赤外パルスレーザ25の発振した700nmのパルスレーザを標本29に導く。DAPIより発した蛍光は、励起ダイクロイックミラー27を透過して、ターレット4の空穴4bを通り、光検出器18で検出される。

【0051】ここで、通常、対物レンズ11は、700nmの赤外領域までは収差補正されていない。したがって、700nmのパルスレーザを用いた場合と488nmのアルゴンレーザを用いた場合とでは、対物レンズ11の焦点面がずれる現象が生じる。図5に焦点面がずれる状況を拡大して示している。

【0052】コンピュータ100は、488nmの観察から700nmの観察に切りかえる時（ターレット4を90°回転させた時）に、ステージ13を移動させて488nmの観察面と700nmの観察面のズレ $\delta$ を補正する。

【0053】このようにして得られた画像をフレオレスセインの発する蛍光を緑、DAPIの発する蛍光を水色のように色分けし、重ねてモニタ101に表示することにより、蛍光クロストークがなく、また2種の蛍光の観察の時間的遅れを、極力少なくでき、かつ赤外レーザとアルゴンレーザの対物レンズの収差による焦点面のズレが生じない観察ができる。

【0054】なお、ステージ13の制御で焦点面のずれを補正するのではなく、光路に対して光路長補正板を挿入することによっても同様の効果を奏することができる。例えば、瞳投影レンズ9から結像レンズ10の間のフォーカル光学系中（集光点を除く）に焦点面のずれ量を補正可能な厚さを有する光路長補正板を挿脱自在に設け、レーザ切換えに連動して挿脱させる。

【0055】（第5の実施の形態）複数の励起フィルタとそれら励起フィルタに対応した反射ミラー及び空穴とをそれぞれ異なる円周上に配置したターレットを使用して励起波長及び光路の切換えを行う。

【0056】図7、図8に実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成（結像レンズ9からステージ13までは省略してあるが第1の実施の形態と同一構成をなす）を示している。図1、図2に示す顕微鏡と同じ機能を有する部位には同一符号を付している。第1の実施の形態と同様に、488nmと568nmの波長を発振するクリプトンアルゴンレーザ1により、フレオレスセインとTEXAS RED<sup>TM</sup>

で2重染色標本を観察するもので、励起ダイクロイックミラー6、バリアフィルタ19、20は第1の実施の形態と同じものを用いている。

【0057】本実施の形態では、ターレット31上に図7（b）に示すように45°間隔で4コづつ交互に48

8 nm 選択の励起フィルタ 31a (△印) と、568 nm 選択の励起フィルタ 31b (●印) を同心円上に配置し、その外側に 488 nm により励起されフレオレスセインより発した蛍光を光検出器 17 へ導くミラー 31c (△印 4ヶ所) と、568 nm により励起され TEXAS RED™ より発した蛍光を光検出器 18 へ導く空穴 31d (△印 4ヶ所) とを同じ 45 度間隔で交互に同じ同心円状に配置している。

【0058】図 7 には励起光照明光路上に 488 nm を選択する励起フィルタ 31a が配置され、光検出器 17 へ蛍光を導くミラー 31c が光路上に配置され、フレオレスセインの発する蛍光を光検出器 17 で検出する状態を示している。

【0059】また図 8 には、励起光照明光路上に 568 nm を選択する励起フィルタ 31b が配置され、光検出器 18 へ蛍光を導く空穴 31d が光路上に配置されて、TEXAS RED™ の発する蛍光を光検出器 18 で検出する状態を示している。

【0060】ターレット 31 を連続的に回転させることにより高速で図 7 と図 8 の状態 (フレオレスセイン又は TEXAS RED™ の観察) を切りかえることができる。走査光学系 7 は、X ガルバノミラー 7a を高速で画面水平方向に走査し、Y ガルバノミラー 7b を X ガルバノミラー 7a が水平方向 1 ライン走査する毎に Y 方向 1 ピクセル (画素) 分動かす。また、モニター 101 の解像度に合わせて X、Y ガルバノミラー 7a、b の走査と光検出器 17、18 の検出タイミングを決めている。本実施の形態では、X ガルバノミラー 7a が 1 ライン走査を終えるごとに、ターレット 31 を 45° 回転させるように走査光学系 7 の走査と、回転ターレット 31 の回転を同期させることにより、図 9 に示すように水平方向 1 ライン毎にフレオレスセインによる蛍光と TEXAS RED™ による蛍光とを取得する。

【0061】さらに、ターレット 31 を 45° 回転させるタイミングとして、X ガルバノミラー 7a の 1 ピクセル停止期間中 (1 ピクセル受光中) に切り換えを行うことにすれば、全てのピクセル (画素) にフレオレスセインによる蛍光の情報と TEXAS RED™ による蛍光の情報とを光検出器 17、18 で検出することが可能となる。

【0062】このような実施の形態によれば、第 1 の実施の形態に記した効果を確保できる上に、フレオレスセインによる蛍光と TEXAS RED™ による蛍光を検出する時間的な遅れを完全になくすることができる。

【0063】(第 6 の実施の形態) 図 10～図 13 を参照して第 6 の実施の形態について説明する。この実施の形態は、クリプトンアルゴンレーザ 35 の発振する 488 nm、568 nm、647 nm の 3 波長を用いてフレオレスセイン、TEXAS RED™、シアニン 5 により発する 3 種の蛍光を 3 つの光検出器 36、37、38

でそれぞれ検出する。

【0064】図 10、図 11、図 12 は図示しないモータに接続された回転ターレット 39 を回転して切替えた 3 段階の状態を示している。回転ターレット 39 は光源側の大円部と標本側の小円部とを光軸方向に所定距離離間させて一体化した 2 重円板構造になっている。

【0065】図 10 (b) に示すように、回転ターレット 39 の小円部は 488 nm を透過する励起フィルタ 39a、568 nm を透過する励起フィルタ 39b、647 nm を透過する励起フィルタ 39c が同一円上に隣接して配置され、その同一円上で中心を挟んで 488 nm 励起フィルタ 39a と対称位置にミラー 39e が配置され、さらにその同一円上で中心を挟んで 568 nm 励起フィルタ 39b、647 nm 励起フィルタ 39c の対称位置にそれぞれ空穴 39g、39m が配置されている。

【0066】また、図 10 (c) に示すように、回転ターレット 39 の大円部は、488 nm 励起フィルタ 39a 等の配置された円と同一径の円上に空穴 39d、39f、39j が 488 nm 励起フィルタ 39a、39b、39c と同一ピッチで配置されている。さらに、空穴 39d 等が配置された円よりも大きい円周上であって空穴 39f、39j とそれぞれ回転中心を挟んで対称位置にミラー 39h、空穴 39n が配置されている。

【0067】図 13 は励起ダイクロイックミラー 40 の透過特性を示している。この励起ダイクロイックミラー 40 は、励起波長の 488 nm と 568 nm と 647 nm を反射し、フレオレスセイン、TEXAS RED™、シアニン 5 の発する蛍光を透過する透過特性を持つ。

【0068】以上のように構成した実施の形態での動作について説明する。図 10 は、488 nm の波長を励起フィルタ 39a で選択し、フレオレスセインの発生した蛍光を光検出器 36 で検出している状態を示している。このような図 10 に示す状態で標本を 1 フレーム走査する。

【0069】図 10 に示す状態では、クリプトンアルゴンレーザ 35 を発した 488 nm、568 nm、647 nm の各波長の多波長レーザ光は、ターレット 39 の空穴 39d を通過し、励起フィルタ 39a により 488 nm の波長が選択される。そして、励起ダイクロイックミラー 40 を反射し、走査光学系 7 のガルバノメータスキャナミラーで反射された後、ミラー 8 を反射し図示しない標本上にビームスポットを形成する。

【0070】標本のフレオレスセインより発した蛍光が逆の光路をたどって励起ダイクロイックミラー 40 を透過する。この励起ダイクロイックミラー 40 を透過した蛍光は結像レンズ 14、ミラー 15、共焦点ピンホール 16 を通り、ターレット 39 に配置されたミラー 39e により反射される。ミラー 39e で反射した蛍光はさらにバリアフィルタ 19 により 488 nm の反射光をカッ



トされてから光検出器36でフレオレスセインの発する蛍光として検出される。図10に示すターレット39の位置で、走査光学系7のガルバノメータスキャナミラーを走査駆動して1フレーム走査を行って、フレオレスセインによる画像を1枚取得する。

【0071】このように、488nmの励起波長で励起したフレオレスセインからの蛍光を1フレームだけ走査したら、図10(b)(c)に示す矢印41方向にターレット39を60°だけ図示しないモータ等により回転させる。その結果、図11に示す状態に変化する。

【0072】図11は568nmの波長を励起フィルタ39bで選択し、TEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光を光検出器37で検出する状態を示している。図11に示す状態で再び標本を1フレーム走査する。

【0073】図11に示す状態では、クリプトンアルゴンレーザ35から発振した488nm、568nm、647nmは、ターレット39上の空穴39fを通過し、励起フィルタ39bにより568nmの波長が選択される。568nmのレーザ光が励起ダイクロイックミラー40で反射され、図10と同じ経路をたどり、標本上に

ビームスポットを形成する。

【0074】そして、TEXAS RED<sup>TM</sup>より発した蛍光が、図10と同様に逆方向に光路を進み、励起ダイクロイックミラー40を透過する。励起ダイクロイックミラー40を透過した蛍光は、結像レンズ14、ミラー15、共焦点ピンホール16を通り、ターレット39上に形成した空穴39gを通過して同ターレット39のミラー39hにより反射され、さらにバリアフィルタ20により568nmの反射光をカットされてから光検出器37でTEXAS RED<sup>TM</sup>の発する蛍光として検出される。したがって、図11に示すターレット39位置で走査光学系7を駆動して1フレーム走査を行うことにより、TEXAS RED<sup>TM</sup>による画像が1枚取得される。

【0075】1フレーム走査が完了したら、ターレット39を図11(b)(c)に示す矢印42の方向に60°だけモータで回転して図12に示す状態にする。図12では647nmの波長を励起フィルタ39cで選択し、シアニン5の発した蛍光を光検出器38で検出している。図12に示す状態で再び標本を1フレーム走査する。

【0076】図12に示す状態では、クリプトンアルゴンレーザ35から発振した、488nm、568nm、647nmは、ターレット39上の空穴39gを通過し、励起フィルタ39cにより647nmの波長が選択される。この励起波長は励起ダイクロイックミラー40により反射され、図10、11と同様に図示しない標本上にビームスポットを形成する。

【0077】647nmの励起波長で励起したシアニン5により発した蛍光は、図10、11と同様に逆方向に

光路を進み、励起ダイクロイックミラー40を透過する。そして、結像レンズ14、ミラー15、共焦点ピンホール16を通り、ターレット39上に形成した空穴39m、39nを通過し、バリアフィルタ43により647nmの反射光をカットしてから光検出器38でシアニン5の発する蛍光として検出される。したがって、図12に示すターレット39の位置で1フレーム走査を行うことにより、シアニン5による画像が1枚取得される。

【0078】以上のようにして、図10、図11、図12に示す状態でそれぞれ取得したフレオレスセインによる画像、TEXAS RED<sup>TM</sup>による画像、シアニン5による画像をそれぞれ色分けしてモニターに重ねて表示する。

【0079】このような実施の形態によれば、3重染色標本の各蛍光色素より発する蛍光の取り込みをガルバノメータスキャナミラーの走査とターレットの回転を同期させて1フレーム走査毎にターレットを切り換えて各蛍光色素毎に行っているため、蛍光クロストークがなく、また各蛍光色素により発する蛍光の取り込みの時間的遅れを、極力少なくできる。

【0080】(第7の実施の形態) 励起波長の選択及び光検出器へ導く光路の切換えのために前述した各実施の形態で採用しているターレット方式ではなく励起波長選択用及び光路切換え用のガルバノミラーを使用する。

【0081】図14、図15に第7の実施の形態となる走査型光学顕微鏡の光学系の構成を示している。この実施の形態は、第1の実施の形態と同様に488nmと568nmを発振するクリプトンアルゴンレーザによりフレオレスセインとTEXAS RED<sup>TM</sup>で2重染色された標本を観察するもので、第1の実施の形態と同じ機能を持つ部位には同じ符号を付している。

【0082】ビームエキスパンダ2で所定ビーム径に調整したレーザ光を第1ガルバノミラー51に入射し、第1ガルバノミラー51を振ることでレーザ光の進行する光路を2つの光路53と光路54とから選択する。一方の光路53には488nmの励起フィルタ55が配置され、もう一方の光路54には568nmの励起フィルタ56が配置されている。すなわち、光路53と54とからいずれかの光路を選択することが励起波長を選択することになる。2つの光路はミックス用ダイクロイックミラー57によって励起ダイクロイックミラー6の配置された一つの光路に導かれる。

【0083】また、共焦点ピンホール16を通過した蛍光を第2ガルバノミラー52に入射し、第2ガルバノミラー52を振ることで蛍光を光検出器17、18に導く2つの光路59、60から選択する。

【0084】ガルバノミラー51の傾きを制御してレーザ光を光路53又は54に切換える。図14に示すように、光路53へレーザ光が導かれるように制御した場合、光路53には488nmを選択する励起フィルタ5

10

20

30

40

50

5が配置されているので、ミックス用ダイクロイックミラー57に入射するレーザ波長は488nmとなる。

【0085】一方、図15に示すようにガルバノミラー51の傾きを制御してレーザ光を光路54に導いた場合は、光路中に568nmを選択する励起フィルタ56が配置されているので、ミックス用ダイクロイックミラー57に入射するレーザ波長は568nmとなる。

【0086】ミックス用ダイクロイックミラー57は、488nmを反射し、568nmを透過する透過特性を持つ。したがって、図14に示すように光路53を進む488nmのレーザ光はミラー58、ミックス用ダイクロイックミラー57を反射して励起ダイクロイックミラー6に入射し、励起ダイクロイックミラー6を反射して走査光学系7、ミラー8を通り、図示しない標本上にビームスポットを結ぶ。また、図15に示すように光路54を進む568nmのレーザ光はミックス用ダイクロイックミラー57を透過し、励起ダイクロイックミラー6を反射して走査光学系7、ミラー8を通り、図示しない標本上にビームスポットを形成する。

【0087】488nmの励起レーザ光で励起されてフレオレスセインにより発した蛍光、568nmの励起レーザ光で励起されてTEXAS RED<sup>TM</sup>により発した蛍光は、逆方向に光路を進み励起ダイクロイックミラー6を透過する。その後、結像レンズ14、ミラー15、共焦点ピンホール16を透過して第2ガルバノミラー52へ入射する。

【0088】ここで、第1ガルバノミラー51による励起波長選択と第2ガルバノミラー52による光路の切換えとが連動するように、図示していないコンピュータによりミラー駆動制御し、しかも第1、第2ガルバノミラー51と走査光学系7の走査とが同期するように3者の動作を制御する。

【0089】今、図14のように第1ガルバノミラー51により488nmが励起波長として選択されていれば、ピンホール16を通過したフレオレスセインの発した蛍光は、第2ガルバノミラー52により光路59の方へ進みバリアフィルタ19で488nmの反射光をカットして、フレオレスセインの発した蛍光として光検出器17で検出される。

【0090】また、図15のように第1ガルバノミラー51により568nmが励起波長として選択されていれば、共焦点ピンホール16を通過したTEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光は、第2ガルバノミラー52により光路60の方へ進み、バリアフィルタ20で568nmの反射光をカットして、TEXAS RED<sup>TM</sup>の発した蛍光として光検出器18で検出される。

【0091】図14に示す状態に制御してフレオレスセインの発する蛍光を取り込む状態と図15に示す状態に制御してTEXAS RED<sup>TM</sup>の発する蛍光を取り込む状態との切り換えを走査光学系7の走査に同期して行

う。具体的には、第1の実施の形態のように1フレーム走査毎の光路切り換えや、第5の実施の形態のように走査光学系7のXガルバノミラー7aの1ライン走査毎の光路切り換えを行うことができる。

【0092】このような実施の形態によれば、2重染色標本の各蛍光色素より発する蛍光の取り込みを、1フレーム走査毎、1ライン走査毎に切換えて各蛍光色素毎に行っているため、蛍光クロストークがなく、また各蛍光色素により発する蛍光の取り込みの時間的な遅れを極力少なくできる。また、励起波長の選択、光検出器への光路切り換えをガルバノメータスキャナで行っているため、標本上のビーム走査を行うガルバノメータスキャナミラーとの同期が取りやすく、1ライン走査毎の切り換え等の高速切り換えを簡単に実現できる。

【0093】(第8の実施の形態) 励起波長の選択及び光検出器へ導く光路の切換えのために前述したガルバノミラー51、52ではなく励起波長選択用及び光路切換え用の音響光学偏向素子(AOD)を使用する。

【0094】図16、図17に第8の実施の形態となる走査型光学顕微鏡の光学系の構成を示している。この実施の形態は、ガルバノミラー51、52を音響光学偏向素子61、62に代えたこと以外は前述の第7の実施の形態とほぼ同じ構成になっている。

【0095】第1音響光学偏向素子61はビームエクスパンダ2からのレーザ光を光路53又は54へ導くように偏向させる機能を持ち、第2音響光学偏向素子62は共焦点ピンホール16を通過した蛍光を光路59又は60へ導くように偏向させる機能を持つ。

【0096】これら第1、第2の音響光学偏向素子61、62の偏向作用を図示していないコンピュータからの制御で第7の実施の形態と同様に連動させることができるので、走査光学系7の走査に同期して第1音響光学偏向素子61により励起波長を選択すると共に、第2音響光学偏向素子62により蛍光を入射する光路を選択することができる。本発明は上記実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内で種々変形実施可能である。

【0097】

【発明の効果】以上詳記したように本発明によれば、蛍光クロストークを除去できるとともに、複数の励起波長による各々の観察の時間的な遅れを抑えることのできる走査型光学顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成図である。

【図2】第1の実施の形態の全体構成図であり図1とは異なる状態を示す図である。

【図3】第2の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の動作説明図である。

【図4】第4の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全

体構成図である。

【図5】第4の実施の形態における焦点ずれ補正原理を説明するための図である。

【図6】励起ダイクロイックミラーの透過特性を示す図である。

【図7】第5の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成図である。

【図8】図7とは異なる状態での第5の実施の形態の全体構成図である。

【図9】第5の実施の形態における取得画像情報の並びを示す図である。

【図10】第6の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成図である。

【図11】図10とは異なる状態での第6の実施の形態の全体構成図である。

【図12】図10、図11とは異なる状態での第6の実施の形態の全体構成図である。

【図13】励起ダイクロイックミラーの透過特性を示す図である。

【図14】第7の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の全体構成図である。

【図15】図14とは異なる状態での第7の実施の形態の全体構成図である。

【図16】第8の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の

全体構成図である。

【図17】図16とは異なる状態での第8の実施の形態の全体構成図である。

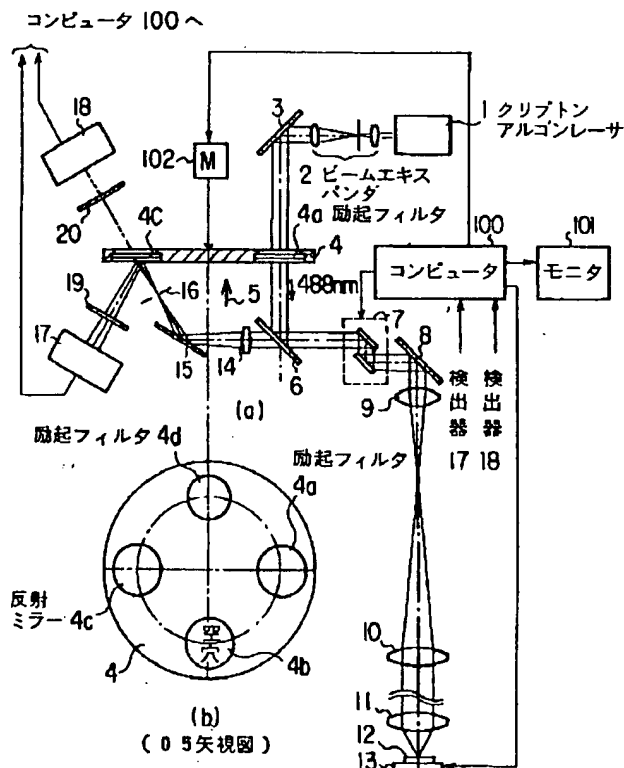
【図18】従来の走査型光学顕微鏡のスキャンヘッド部の構成図である。

【図19】各フィルタブロックの特性図である。

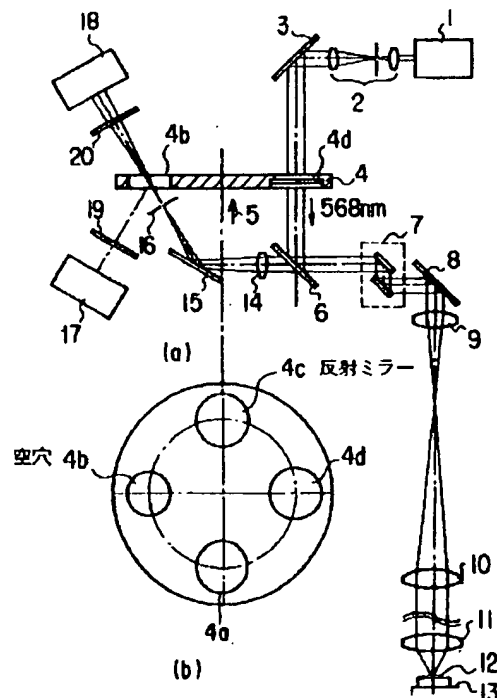
【符号の説明】

- 1…クリプトンアルゴンレーザ
- 2…ビームエキスパンダ
- 3…ミラー
- 4…励起フィルタユニット
- 4a、4d…励起フィルタ
- 4b…空穴
- 4c…反射ミラー
- 6…励起ダイクロイックミラー
- 7…走査光学系
- 8…ミラー
- 11…対物レンズ
- 12…標本
- 16…共焦点ピンホール
- 17、18…光検出器
- 100…コンピュータ
- 101…モニタ
- 102…モータ

【図1】

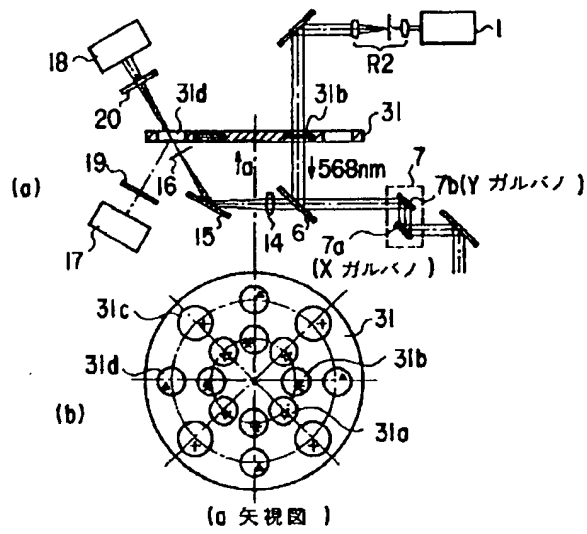


【図2】

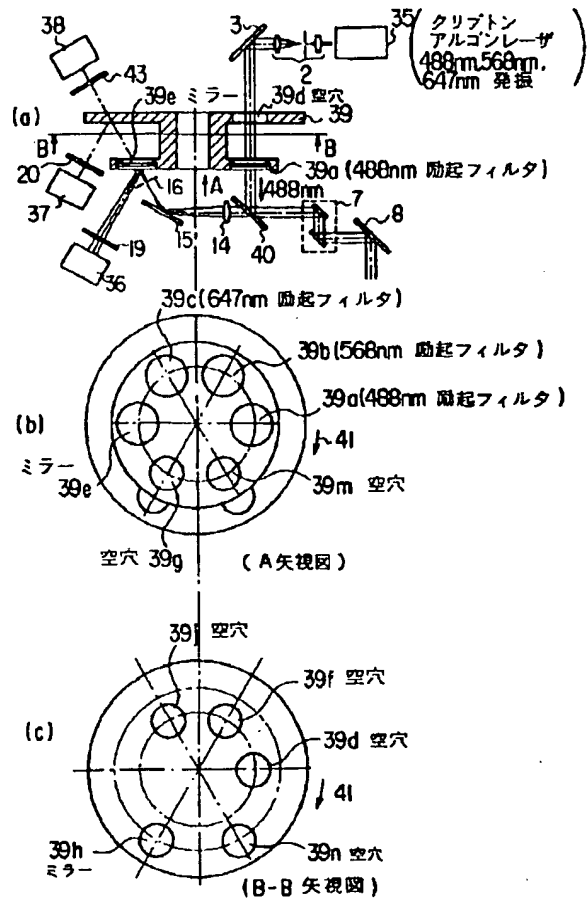




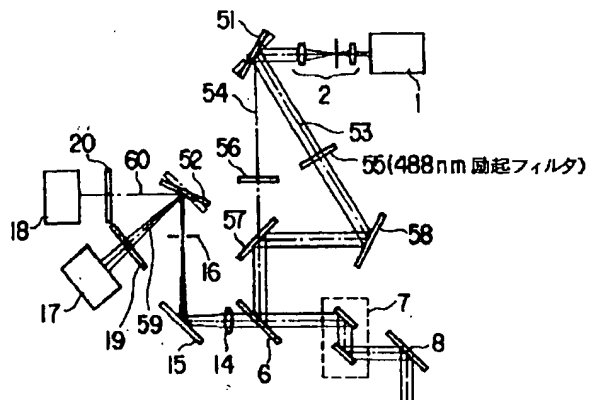
【図 8】



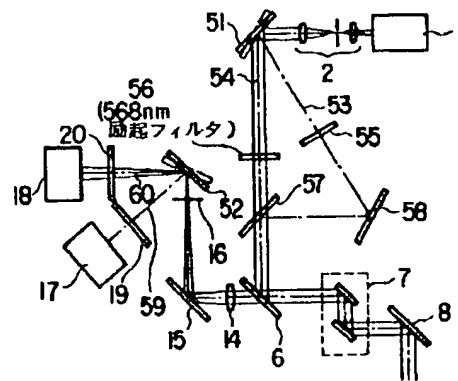
【図 10】



【図 14】

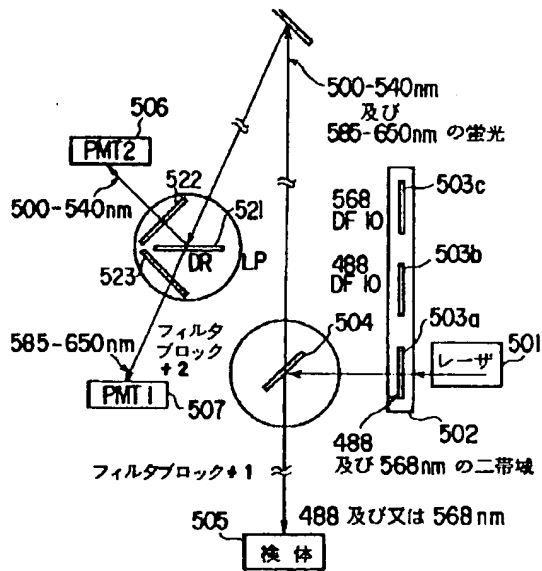


【図 15】

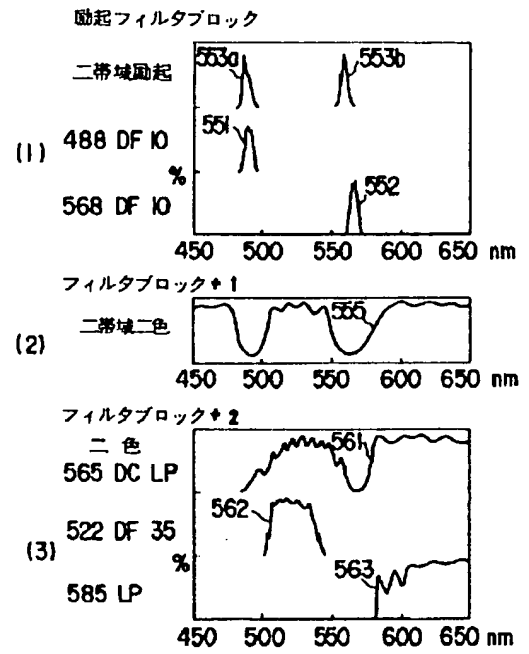




【図 18】



【図 19】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**